Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

THESIS MARBURG 1968

Untersuchungen zur biochemischen Differenzierung nichtproliferierender Bakterien aus den Ordnungen Pseudomonadales, Eubacteriales und Actinomycetales

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Klaus Royé
aus Osnabrück

Marburg 1968

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

Untersuchungen zur biochemischen Differenzierung nichtproliferierender Bakterien aus den Ordnungen Pseudomonadales, Eubacteriales und Actinomycetales

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Klaus Royé
aus Osnabrück

Marburg 1968

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der
Universität Marburg am: 1.2.1968

Gedruckt mit der Genehmigung der Fakultät

Dekan: Professor Dr.med. R. Siegert

Referent: Professor Dr.med. R. Siegert

Correferent: Professor Dr.med. et Dr.med.dent. habil. H. Heuser

Meinen Eltern in Dankbarkeit

gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153305_0065

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Methodik	3
1. Bakterienstämme	3
2. Züchtung	3
3. Versuchsbedingungen	6
C. Ergebnisse	14
1. Übersicht über die bei 47 Bakterienstämmen aus den Ordnungen Pseudomonadales, Eubacteriales und Actinomycetales gefundenen Reaktionen	14
2. Einfluß der Inkubationsdauer auf das Reaktionsergebnis	17
3. Der Abbau der einzelnen Stoffklassen	20
a) Kohlenhydrate	20
b) Carbonsäuren	21
c) Glycoside	22
d) Aminosäuren	24
e) Substrate der Esterasen und Lipasen	24
f) Substrate der Phosphatasen	25
D. Besprechung	26
1. Problematik der Methode zur biochemischen Differenzierung von Bakterien	26
2. Aussagekraft der einzelnen Testmöglichkeiten	27
E. Zusammenfassung	30
F. Literatur	31

A. Einleitung

Die biochemischen Leistungen der Bakterien sind sowohl für die Keimdifferenzierung der medizinischen Diagnostik als auch für die technische Mikrobiologie von größtem praktischen Interesse und auch von großer Bedeutung für viele Forschungsgebiete, z.B. die Bakterienphysiologie und Genetik. Aus den genannten Gründen ist eine möglichst umfassende biochemische Charakterisierung der Keime wünschenswert. Hinzu kommt die Notwendigkeit, die Differenzierungsverfahren zu beschleunigen, um schneller mit dem Beginn therapeutischer und prophylaktischer Maßnahmen im Rahmen der Seuchenbekämpfung einsetzen zu können. Gerade in den letzten Jahren sind zahlreiche Methoden zur Vereinfachung und Beschleunigung der mikrobiologischen Diagnostik angegeben worden (siehe z.B. 1 - 26).

Die zur Differenzierung heute gebräuchlichen Verfahren bestehen darin, daß die isolierten Keime in dazu vorbereitete Mangelnährmedien geimpft werden. Diese Medien enthalten Zusätze wie Zucker, Alkohole, Harnstoff, Säuren oder Nitrat u.a. Gleichzeitig mit der Bakterienvermehrung wird der Abbau dieser speziellen Zusätze beobachtet.

Von diesem Verfahren unterscheiden sich die nachfolgenden Untersuchungen dadurch, daß ausschließlich mit nichtproliferierenden Keimen in einfach zusammengesetzten Medien, die lediglich das Substrat in Pufferlösung enthalten, gearbeitet wird.

Untersuchungen mit nichtproliferierenden Keimsuspensionen

sind bereits von verschiedenen Autoren (5, 7, 8, 14, 20, 24 - 28) beschrieben worden. Diese Verfahren unterscheiden sich wesentlich von den allgemein üblichen der sogenannten "Bunten Reihe", bei der in komplexen Nährmedien alle Stadien der bakteriellen Entwicklung durchlaufen werden. Hierbei kann das Medium durch Stoffwechselvorgänge durchgreifend verändert werden.

Bei der Prüfung biochemischer Leistungen nichtproliferierender, gewaschener Keimsuspensionen wird in einem definierten Nährmilieu unter reproduzierbaren Bedingungen gearbeitet. Der Abbau eines Substrates läßt sich in eindeutiger Weise entweder an der Bildung farbiger Reaktionsprodukte, durch Farbänderung eines Indikators oder durch Nachweis eines definierten Abbauproduktes erkennen.

Es ist anzunehmen , daß bei diesem Verfahren die Permeabilität der Zellmembran gegenüber den verschiedenen angebotenen Substraten eine größere Rolle spielt als bei der biochemischen Prüfung sich vermehrender, wachsender Mikroorganismen in komplexen Medien.

In den folgenden Untersuchungen werden z.T. erstmals biochemische Reaktionen mit Kohlenhydraten, Alkoholen, Glykosiden, organischen Säuren und Substraten von Esterasen, Lipasen und Phosphatasen an nichtproliferierenden Keimsuspensionen durchgeführt. Das wichtigste Ziel dieser Arbeit besteht darin, Erfahrungen über die Brauchbarkeit derartiger Reaktionen für die bakterielle Diagnostik zu sammeln.

Die vorliegenden Untersuchungen beschränken sich auf einige, vom medizinischen Standpunkt aus interessante Bakterienstämme aus verschiedenen Ordnungen und Familien.

B. Methodik

1. Bakterienstämme

Die Bakterienstämme sind mit ihren Bezeichnungen und Sammlungsnummern sowie den zu ihrer Anzucht verwendeten Nährmedien in Tabelle 1 zusammengestellt. Die Keime stammen aus der Stammsammlung des Hygiene-Institutes der Universität Marburg.

2. Züchtung

Die verwendeten Bakterienkulturen sind in der Regel auf Trypticase Soy Agar (Baltimore Biological Laboratory, Inc.) konserviert und bei Bedarf auf Blutagar abgeimpft worden. Die Keime wurden für die Untersuchungen in den in Tabelle 1 angegebenen Medien (30 ml-Mengen in 50 oder 100 ml-Erlenmeyerkolben mit Watteverschluß und Zinnkappenfolie) ca. 12 Stunden unbewegt bei 37°C gezüchtet. Vor der Ernte erfolgte zur Kontrolle auf ihre Reinheit eine Aussaat auf Blutagar. Die Keime wurden dann aus der Nährlösung abzentrifugiert (5 Minuten lang bei 15000 g), anschließend zweimal mit 9,9%iger Kochsalzlösung durch wiederholtes Zentrifugieren gewaschen und in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert.

Nach nephelometrischer Messung der Keimdichte mit Hilfe von Eichkurven am Eppendorff-Photometer bei 578 mu wurde die Keimsuspension auf 4-8 mg Trockengewicht/ml eingestellt (5, 24). Für jeden Versuchsansatz sind 0,3 ml dieser Keimsuspension erforderlich.

Tabelle 1

Bakterienstämme:	Sammlungs-Nr. H I M	Medium
1) Pseudomonas aeruginosa	108-2	Tr.Soy Br.
2) Pseudomonas fluorescens	108-1	Tr.Soy Br.
3) Pseudomonas putida	74-3	Tr.Soy Br.
4) Aeromonas hydrophila	76-2	Tr.Soy Br.
5) Spirillum volutans	111-1	PP-Glu
6) Vibrio comma	66-1	Tr.Soy Br.
7) Chromobacterium violaceum	112-1 (2076 CCM)	Tr.Soy Br.
8) Achromobacter mucosus	21-1 (10303 NCTC)	Tr.Soy Br.
9) Achromobacter haemolyticus (Subsp.haemolyticus)	22-2 (10305 NCTC)	Tr.Soy Br.
10) Achromobacter haemolyticus (subsp.alcaligenes)	23-1 (10306 NCTC)	Tr.Soy Br.
11) Achromobacter metalcaligenes	47-1	Tr.Soy Br.
12) Flavobacterium sp.	48-3	Tr.Soy Br.
13) Escherichia coli (O 86)	16-4	Tr.Soy Br.
14) Salmonella typhimurium	39-1	Tr.Soy Br.
15) Citrobacter freundii	35-5	Tr.Soy Br.
16) Klebsiella pneumoniae	108-5	Tr.Soy Br.
17) Serratia marcescens	32-3	Tr.Soy Br.
18) Proteus vulgaris	108-4	Tr.Soy Br.
19) Pasteurella pseudotuberculosis (Typ III)	71-3	Tr.Soy Br.
20) Pasteurella multocida (Typ D CARTER)	51-5	Tr.Soy Br.
21) Bordetella bronchiseptica	14-2	Tr.Soy Br.
22) Haemophilus influenzae	111-2	PP-Glu-Hae-NAD
23) Haemophilus aegyptius	116-8	PP-Glu-Hae-NAD

Bakterienstämme:	Sammlungs-Nr. H I M	Medium
24) Brucella suis	48-5	Tr.Soy Br. + PP - Glu
25) Moraxella nonliquefaciens	87-5	Tr.Soy Br.
26) Bacteroides sp.	117-3	Tr.Soy Br. + Tar
27) Staphylococcus aureus	44-1	Tr.Soy Br.
28) Staphylococcus epidermidis	104-7	Tr.Soy Br.
29) Micrococcus sp.	109-3	Tr.Soy Br.
30) Sarcina sp.	65-1	Tr.Soy Br.
31) Neisseria catarrhalis	108-6	P P
32) Neisseria meningitidis	63-4	P P - Glu
33) Veillonella parvula	109-6	P P - Glu
34) Diplococcus pneumoniae (Typ III)	111-4 (7978 NCTC)	P P - Glu
35) Streptococcus faecalis	109-2	P P - Glu
36) Peptostreptococcus sp.	117-1	P P+Glu+Tar
37) Corynebacterium diphtheriae	55-5	Tr.Soy Br. + P P - Glu
38) Corynebacterium xerosis	109-4	Tr.Soy Br.
39) Listeria monocytogenes (Typ 2)	58-4	Tr.Soy Br.
40) Erysipelothrix insidiosa (Typ B)	103-2	P P - Glu
41) Arthrobacter pascens	82-1 (8910 NCIB)	Tr.Soy Br.
42) Bacillus cereus	52-6 (8035 ATCC)	Tr.Soy Br.
43) Bacillus subtilis	51-3 (6633 ATCC)	Tr.Soy Br.
44) Clostridium sp.	120-2	Thioglyco-latbouillon
45) Clostridium tetani	117-2	P P - Glu
46) Nocardia asteroides	110-7	Tr.Soy Br.
47) Mycobacterium phlei	32-3	Tr.Soy Br. + P P - Glu

Medien:

Tr.Soy Br. = Trypticase Soy Broth (Baltimore Biological Laboratory)

P P = Proteose peptone No. 3 (Difco Laboratories) 2 %;
NaCl 0,6 %; Tris(hydroxymethyl)-aminomethan q.s. pH 7,4;
Glucose (= Glu) (separat sterilisiert) 0,25 %;
Zusätze: Hae = Hämin 0,5 ug/ml;
NAD 1,0 ug/ml

Thioglycolat = Thioglycolatmedium mit Glucose (Baltimore Biological Laboratory)

Tar = Leberbouillon nach Tarozzi

---

3. Versuchsbedingungen

Die Untersuchungen erfolgten nach dem von BÜRGER (24 -26) beschriebenen Verfahren, wobei die oben angegebene Keimsuspension mit gleichem Volumen einer Substratlösung zusammengegeben und anschließend bei 37°C inkubiert wurde.
Eine Übersicht über die Reaktionsbedingungen und die in den einzelnen Reaktionen nachgewiesenen Spaltprodukte enthält Tabelle 2 (24-26). Mit Ausnahme derjenigen Reaktionen, bei denen eine Gasentwicklung beobachtet werden mußte, wurden alle Untersuchungen in sterilen Reagenzgläsern ausgeführt.

Zur Beobachtung der CO_2-Entwicklung aus D-Glucose, D(-)-Mannit und Natriumformiat, der Ammoniakbildung aus Harnstoff

sowie der Schwefelwasserstoffbildung aus L(+)-Cystein und L(-)-Cystin ist eine von BÜRGER (24) eigens hierfür ent= wickelte Kammer benutzt worden.

Alle Ansätze sind doppelt angelegt und durch Kontrollen, die lediglich das Substrat enthielten, sowie positive Ver= gleichswerte gesichert worden.

Obgleich die Versuchsordnung völlig steriles Arbeiten nicht erfordert, wurde am Ende der Beobachtungszeit, vor Zugabe der Nachweisreagenzien, eine Reinheitskontrolle an minde= stens 10 willkürlich ausgewählten Ansätzen durch Aussaat auf Blutagar durchgeführt.

Die Versuchsdauer betrug in allen Fällen, in denen ein ge= sonderter Nachweis der Spaltprodukte erforderlich war, 4 bis maximal 6 Stunden. War nach 4 Stunden der Reaktionsaus= fall in einem Ansatz negativ, so wurde im Parallelansatz der Nachweis erst nach 6 Stunden wiederholt.

In allen Fällen, in denen aus den Substraten farbige Spalt= produkte entstanden oder pH-Verschiebungen Indikatorum= schläge verursachten oder Gasbildung eintrat, wurden die Ansätze bis zu 3 Stunden alle 30 Minuten und danach stünd= lich bis zur 6. Stunde kontrolliert.

Tabelle 2

Substratlösungen:	Nachweisreaktionen:
Kohlenhydrate:	
L(+)Arabinose ($2x10^{-1}$m),	Säurebildung bewirkt
D-Ribose ($2x10^{-1}$m),	Indikatorumschlag
D(+)Xylose ($2x10^{-1}$m),	von blau nach gelb
D(-)Fructose ($1,67x10^{-1}$m),	
D(+)Galactose ($1,67x10^{-1}$m),	
D - Glucose ($1,67x10^{-1}$m),	
D - Mannose ($1,67x10^{-1}$m),	
L(+)Rhamnose ($1,83x10^{-1}$m),	
L-Sorbose ($1,67x10^{-1}$m),	
D(+)Lactose ($8,7x10^{-1}$m),	
Maltose ($8,7x10^{-2}$m),	
D(+)Saccharose ($8,7x10^{-2}$m),	
d-(+)Trehalose ($8,7x10^{-2}$m),	
Raffinose ($6x10^{-2}$m),	
in m/300 P-p, pH 7,4 mit	
Bromthymolblauzusatz	
Alkohole:	
Glycerin ($1,1x10^{-1}$m),	Säurebildung bewirkt
Adonit ($1,97x10^{-1}$m),	Farbumschlag von
Dulcit ($1,65x10^{-1}$m),	blau nach gelb
meso-Inosit ($1,67x10^{-1}$m),	
D(-)Mannit ($1,65x10^{-1}$m),	
D(-)Sorbit ($1,65x10^{-1}$m)	
in m/300 P-p, pH 7,4 mit	
Bromthymolblauzusatz	

Substratlösungen:	Nachweisreaktionen:
Carbonsäuren:	
Natriumformiat ($1,5x10^{-1}$m), Natriumcitrat ($5,1x10^{-3}$m), Natriummalonat ($1,2x10^{-2}$m), Natriummucat ($6,2x10^{-3}$m), Natrium-d(-)tartrat ($6,5x10^{-3}$m), in P-p mit NaOH auf pH 5,6 eingestellt und Bromthymol=blauzusatz als Indikator	Bei Alkalisierung Indikatorumschlag von gelb nach blau
Gasbildung aus:	
Natriumformiat ($5,9x10^{-1}$m), in m/150 P-p, pH 6,0	Gasblasen
D - Glucose ($1,67x10^{-1}$m), D(-)Mannit ($1,65x10^{-1}$m), in m/300 P-p, pH 7,4	Gasblasen
Harnstoff ($1,67x10^{-1}$m) in m/15 P-p, pH 7,2	Ammoniak bewirkt Farbumschlag des Indikators Phenol=rot von gelb nach rot
L(+)Cystein ($4,95x10^{-1}$m), L(-)Cystin ($1,25x10^{-2}$m)	H_2S bewirkt Schwär=zung durch PbS-Bildung
Aminosäuren:	
L-Arginin ($1,15x10^{-1}$m), L-Lysin ($1,38x10^{-1}$m), L-Ornithin ($1,52x10^{-1}$m) in wäßriger Lösung auf pH 6,0 eingestellt	Alkalisierung bewirkt Farbumschlag des In=dikatorgemisches (Bromkresolpurpur und Kresolrot) von gelb n.rot-violett

Substratlösungen:	Nachweisreaktionen:
L-Phenylalanin bei 40°C gesättigte wäßrige Lösung mit n/10 NaOH auf pH 7,2 eingestellt	Phenylbrenztrauben=säure gibt mit Fe-III-Salzen grüngefärbte Komplexe
D,L-Tryptophan bei 40°C gesättigte wäßrige Lösung mit n/10 NaOH auf pH 7,2 eingestellt	a) Indolbrenztrauben=säure gibt mit Fe-III-Salzen einen rotgefärbten Komplex b) Indolnachweis durch Kondensation mit p-Dimethylaminobenzaldehyd (Rotfärbung)
Kaliumnitrat ($1x10^{-1}$m) mit n/100 NaOH auf pH 7,2 eingestellt	Nitrit färbt sich mit Sulfanilsäure und a-Naphthylamin rot
Glycoside:	
Aesculin a) halbgesättigte wäßrige Lösung in m/300 P-p, pH 7,4 mit Bromthymolblauzusatz	Säurebildung bewirkt Indikatorumschlag von blau nach gelb
b) halbgesättigte wäßrige Lösung in 0,5m P-p, pH 7,4	6,7-Dihydroxycumarin gibt mit Ferricitrat eine Braunfärbung
p-Arbutin ($2,2x10^{-1}$m) a) in m/300 P-p, pH 7,4 mit Bromthymolblauzusatz	Säurebildung bewirkt Indikatorumschlag von blau nach gelb

Substratlösungen:	Nachweisreaktionen:
b) in 0,5m P-p, pH 7,4	Phloroglucin gibt mit Hydrochinon eine Rot= färbung
D-Salicin (wäßrige, bei 40°C gesättigte Lösung) a) in m/3000 P-p, pH 7,4 mit Bromthymolblauzusatz	Säurebildung bewirkt Indikatorumschlag von blau nach gelb
b) in 0,5m P-p, pH 7,4	o-Hydroxybenzylalkohol bildet mit 4-Amino= antipyrin eine rotge= färbte, mit 2,6-Di= bromchinon-4-chlorimid eine blaugefärbte Verbindung
6-Brom-2-naphthyl-ß-D-galacto-pyranosid ($7{,}8 \times 10^{-4}$m) in 0,5m P-p, pH 7,0	ß-Naphthol kuppelt mit diazotiertem o-Diani= sidin zu einem rot-braunen Farbstoff. 4-Aminoantipyrin gibt mit ß-Naphthol eine Grünfärbung.
o-Nitrophenyl-ß-D-galacto-pyranosid (1×10^{-3}m) in T-p(J=0,1), pH 7,2	p-Nitrophenol ist in alkalischer Lösung gelb gefärbt
Indoxyl-ß-D-glucosid ($1{,}75 \times 10^{-3}$m) in 0,2m P-p, pH 8,0	Indoxyl wird durch Luftsauerstoff in al= kalischer Lösung zu Indigo oxydiert
Phenolphthaleinglucuronid ($1{,}95 \times 10^{-4}$m) in Acet-p, pH 5,4	Phenolphthalein färbt sich in alkalischer Lösung rot

Substratlösungen:	Nachweisreaktionen:
Substrate der Esterasen und Lipasen:	
a-Naphthylacetat ($1{,}07 \times 10^{-3}$ m), Naphthol-AS-acetat ($6{,}6 \times 10^{-4}$ m) in P-p (J=0,05), pH 7,4	Freiwerdendes a- bzw. ß-Naphthol wird entweder mit Naphthionsäure zu einem roten Farbstoff gekuppelt oder durch Farbreaktion mit 4-Aminoantipyrin (a-Naphthol ergibt Rotfärbung, ß-Naphthol Blau-Grünfärbung) nachgewiesen.
Indoxylacetat ($2{,}3 \times 10^{-3}$ m), Indoxylbutyrat ($1{,}95 \times 10^{-3}$ m) in 0,1m T-p, pH 8,5	Indoxyl wird in alkalischer Lösung durch den Luftsauerstoff zu Indigo oxydiert.
Caprylsäure-ß-naphthylester ($1{,}83 \times 10^{-3}$ m), Laurinsäure-ß-naphthylester ($1{,}53 \times 10^{-3}$ m) suspendiert in P-p, (J=0,05), pH 7,4	4-Aminoantipyrin ergibt mit ß-Naphthol eine Blau-Grün-Färbung.
p-Nitrophenyllaurat ($1{,}56 \times 10^{-3}$ m), p-Nitrophenylmyristat ($1{,}43 \times 10^{-3}$ m) suspendiert in 0,2m P-p, pH 7,4	p-Nitrophenol färbt sich in alkalischer Lösung gelb

Substratlösungen:	Nachweisreaktionen:
Substrate der Phosphatasen:	
di-Na-phenylphosphat ($4,6 \times 10^{-3}$m) in Carb-p, pH 9,3	2,6-Dibromchinon-4-chlorimid gibt mit Phenol in alkalischer Lösung eine Blaufärbung
a-Naphthylphosphat ($1,22 \times 10^{-3}$m) a) in Acet-p, pH 5,2 b) in T-p, pH 8,3	a-Naphthol läßt sich mit diazotiertem Naphthionat zu einem roten Farbstoff kuppeln
p-Nitrophenylphosphat ($6,47 \times 10^{-3}$m) a) in Gly-p, pH 10,5 b) in Cit-p, pH 4,8	p-Nitrophenol färbt sich in alkalischer Lösung gelb
Phenolphthaleindiphosphat ($1,25 \times 10^{-4}$m), Colaminphenolphthaleindiphosphat ($1,39 \times 10^{-4}$m) a) in Acet-p, pH 5,4 b) in V-p, pH 9,7	Phenolphthalein ist in alkalischer Lösung rot gefärbt

Erläuterungen zu Tabelle 2:

P-p	: Phosphatpuffer
T-p	: Trishydroxymethylaminomethanpuffer
Acet-p	: Acetatpuffer
Gly-p	: Glycinpuffer
Carb-p	: Carbonatpuffer
Cit-p	: Citratpuffer
V-p	: Veronalpuffer

C. Ergebnisse

1. Übersicht über die bei 47 Bakterienstämmen aus den Ordnungen Pseudomonadales, Eubacteriales und Actinomycetales gefundenen Reaktionen

Die Versuchsergebnisse sind in den Tabellen 3a, b zusammengestellt. Alle Substrate, mit denen keine, und alle, mit denen stets positive Ergebnisse registriert werden konnten, sind nicht in der Tabelle enthalten, weil sie eine Differenzierung nicht ermöglichen. Folgende Substrate wurden von keinem der untersuchten Bakterienstämme angegriffen: Natriummucat und Natrium-d-(-)-tartrat (Alkalisierung), Indoxylsulfat, L-Cystin-di-ß-naphthylamid (H_2S-Bildung) sowie Naphthol-AS-acetat. Dagegen wurde a-Naphthylacetat von allen untersuchten Bakterienarten gespalten.

Alle Ergebnisse wurden zur Auswertung auf Lochkarten übertragen. Sie zeigte, daßsich alle geprüften Keime durch ihre biochemischen Leistungen unterscheiden lassen.
Die allen Vertretern einer Keimgruppe gemeinsamen Reaktionen sowie alle Fälle, in denen eine Stoffklasse (z.B. Alkohole, Carbonsäuren u.a.) von den Bakterienstämmen einer Keimgruppe nicht angegriffen worden sind, wurden in den Tabellen 4a, b zusammengestellt.
Aus den Tabellen 4a, b geht hervor, daß sich die untersuchten Keimgruppen voneinander unterscheiden lassen. Ferner ist ersichtlich, daß einige Keimfamilien unter den gegebenen Bedingungen nicht in der Lage waren, die angebotenen Alkohole, Carbonsäuren, die Aminosäuren L-Phenylalanin und D,L-Ornithin zu Phenylbrenztraubensäure bzw. Indolbrenztraubensäure

Tab. 3a

	Kohlenhydrate															Alkohole							Carbonsäuren										
	[illegible]-Arabinose	[illegible]	D(+)-Xylose	D(-)-Fructose	D(+)-Galactose	D-Glucose	D-Glucose (Gas-Bildung)	D-Mannose	L(+)-Rhamnose	L-Sorbose	D(+)-Lactose	Maltose	D(+)-Saccharose	d(+)-Trehalose	Raffinose	Glycerin	Adonit	Dulcit	meso-Inosit	D(-)-Mannit	D(-)-Mannit (Gasbildung)	D(-)-Sorbit	Natriumformiat	Natriumformiat (Gas-Bildung)	Natriumcitrat	Natriummalonat	NO_2 (Nitrit-Bildung)	Harnstoff (NH_3-Bildung)	L(+)-Cystein (H_2S-Bildung)	L(-)-Cystin (H_2S-Bildung)	L-Phenylalanin (Phenylbrenztraubensäure-Bildung)	L-Tryptophan (Indolylbrenztraubensäure-Bildung)	L-Tryptophan (Indol-Bildung)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
[illegible]																																	
[illegible]	-		+			.									.	-	.						.		+	.	+ [illegible]			-	-		
[illegible] rescens		.	.		.	+		.						.	.			-	-	-	-	-	.	-		+	+ [illegible]	+	.	-	-	-	-
Pseudomonas putida	.		.		+	+		.							.				-	-	.	-	.	-	+	-		.	-	-	-	-	-
[illegible]	.	.		.		.	.	.				.	.	.	-	-		-	.		-	-	-	-	-	-	.	-	-	-	+	-	-
[illegible]	-		-					-						.	-	-				.	-	-	-	-	.	-	-	-	+	-	-	-	-
Vibrio comma	-	+	-	-	.	+ 60	-		-	-		-	+ 60	-	-	-			-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
[illegible]bacteriales																																	
Rhizobiaceae																																	
Chromobacterium [illegible]	.	-		.	.	.	.	.	+				-	+	-	+	-		.	+	.	-	-	-	.	-	+		+ 60		-	-	-
[illegible]																																	
A[illegible] cosus	+	+	+	-	+ 120	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	.	-		.	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
A[illegible] molyticus (22-2)	+	-	-		+	+		+			+	-		-	-	-	-	-	-		-	-	+	-	-	-	-	.	+	-	-	.	-
[illegible]	-										-	-		.	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+		-	-	.	+	-	-	-	-
[illegible]	-	.		-				.	-			-	.	.	-	-	-		-	[illegible]	.	-	-	-	-	-	-		-		.		-
Flavobacterium sp.	+		+	-		-	-	+		-		-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-			
[illegible]																																	
[illegible]	+		+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+				+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+		+	+ [illegible]
[illegible]	+	+	-	+	+ 60	+ 60	-	+ [illegible]			-	+ [illegible]	+	+ [illegible]	.	-	-			+ [illegible]	+	+	+ [illegible]	+	+		+	-	+ [illegible]	+ [illegible]	-	-	-
Citrobacter freun[illegible]	+ [illegible]	+ [illegible]	+	+ 30	+ 30	+ 30	+	+ 120	+	-	+	-	-	+ 150		+		+	-	+ [illegible]	+	+ [illegible]	+ [illegible]	+	+		+	-	+ [illegible]	+ [illegible]	+	-	-
[illegible] pneumoniae	+ 120	+ 120		+ 120	+ 120	+ 30	+ 180	+ 120	-		+	+ 120	+ 120	+ 1[illegible]	+ [illegible]	+ [illegible]	+		+	+ 1[illegible]	+ [illegible]	+ [illegible]	+ [illegible]	+	-	+	+	+	+	-	-	.	-
Serratia [illegible]	-	+ 30		+ [illegible]	-	+ 30	-	+ [illegible]		-		+ [illegible]	+ [illegible]	+ [illegible]	-	+			+	+	-	+	+		+	-	+ 180	-	+ [illegible]	+ [illegible]	-	-	-
Proteus vulgaris	-	+		+	.	+ [illegible]	+	-			-	+ [illegible]	+ [illegible]	-		+				-			+	.	-		+	+ [illegible]	+ [illegible]	+ [illegible]	+	+	+ 180
Brucellaceae																																	
Pasteurella pseudotuberculosis	+	-	-	+	-	+ 120	-	+	-	-	-	+ 120	-	-	-	-	-	-	-	+		-	-				.	+ [illegible]	+ [illegible]	+ [illegible]		-	-
Pasteurella [illegible]	-	-	-		.	-	(+)	+	-	-	-	+		-	-	-	-	-	-				+	-	-	-	-	-	+ [illegible]	-	-	-	+ 180
[illegible] bronchiseptica	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				-	-	-		-	-	+	-	+ 240	+ 120	+ 120	-	-		-
Haemophilus influenzae	+	+	+	+	+	+ 1[illegible]	-	+ 180	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+		-	.	+
[illegible]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	.			-		+	-		-	-	-	-
[illegible]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-		.	-
Moraxella nonliquefaciens	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ 240		.	-	-	-	-
Bacteroidaceae																																	
Bacteroides sp.	+ 60	+ 60	+ 60	+ 120	+ 120	+ 60	+	+ 120	+	[illegible]	+ 180	+ 120	+ 120	+ 120	+ 120	+ 60	+ 60	+ 60	+ 60	+ 60	-	+ 60	-	-	-	-	-	-	+ 60	+	-	-	-
Micrococcaceae																																	
Staphylococcus aureus	-	-	-	+ 120	-	+ 120	-	+	-	-	-	+ 120	+ 120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ 210	+ 190	+	-	-	-	-
Staphylococcus epidermidis	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+ 240	-	-	-	-	-	-
Micrococcus sp.	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Sarcina sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Neisseriaceae																																	
Neisseria catarrhalis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+		-	-	-
Neisseria meningitidis	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+ 120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Veillonella [illegible]	-	-	-	-	-	-	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			-	-	-	-	.	+	-	-	-	-
Lactobacillaceae																																	
Diplococcus pneumoniae	-	-	-	.	+	+	-	+	-	-	-	.	+	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	.	-	-	-	-	-	-	-	-
Streptococcus faecalis	-	-	-	+ 120	+	+ 120	-	+	-	-	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
[illegible] sp.	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ 120	-	-	-	-
Corynebacteriaceae																																	
Corynebacterium diphtheriae	-		-	+ 120	+ 60	+ 60	-	+ 60	-	-	-	+ 60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Corynebacterium xerosi	-	+	-	+	+	+	-	-	-			+	+		-	-	.	-	-	-	-	-	.		-	-	-	.	-	-	-	-	-
Listeria monocytogenes	-	-	-	+ 120	-	+ 60	-	+ 120	-	-	-	+ 120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-
Erysipelothrix insidiosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Arthrobacter pascens	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Bacillaceae																																	
Bacillus cereus	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+ 240	-	+ 60	+ 120	-	-	-
Bacillus subtilis	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Clostridium sp.	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clostridium tetani	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Actinomycetales																																	
Nocardia asteroides	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+ 180	+	+	-	-	-
Mycobacterium phlei	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Erläuterungen: Bei den Kohlenhydraten, Alkoholen und den Glycosiden Aesculin, p-Arbutin und Salicin wurde die Säurebildung, bei Carbonsäuren und den Aminosäuren L-Arginin, L-Lysin und L-Ornithin (Decarboxylasereaktion) die Alkalisierung registriert. Zur Beurteilung der enzymatischen Substratspaltung in allen anderen Gruppen dienten spezielle Nachweise der Spaltprodukte.

Zeichenerklärung:
+ = positiver Reaktionsausfall
− = negativer Reaktionsausfall
(+) = unklarer Befund
Zahlen = Inkubationsdauer in Minuten. In allen anderen Fällen betrug die Inkubationszeit 6 Stunden.

Tab. 3b

[illegible]	[illegible]
Pseudomonas [illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]
[illegible]	
[illegible]	
[illegible]	[illegible]
[illegible]	
[illegible] mucosus	[illegible]
[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]
[illegible]	
[illegible]	[illegible]
Salmonella typhimurium	[illegible]
Citrobacter [illegible]	[illegible]
[illegible] pneumoniae	[illegible]
[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]
[illegible]	
Pasteurella pseu[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]
Brucella suis	[illegible]
[illegible] nonliquefaciens	[illegible]
[illegible]	
Bacteroides sp.	[illegible]
[illegible]	
[illegible] aureus	[illegible]
[illegible] epidermidis	[illegible]
Micrococcus sp.	[illegible]
Sarcina sp.	[illegible]
Neisseriaceae	
[illegible] catarrhalis	[illegible]
[illegible]	[illegible]
Veillonella parvula	[illegible]
[illegible]	
[illegible] pneumoniae	[illegible]
[illegible] faecalis	[illegible]
[illegible] sp.	[illegible]
Corynebacteriaceae	
Corynebacterium [illegible]	[illegible]
Corynebacterium xerosis	[illegible]
Listeria [illegible]	[illegible]
Erysipelothrix insidiosa	[illegible]
Arthrobacter pascens	[illegible]
Bacillaceae	
Bacillus cereus	[illegible]
Bacillus subtilis	[illegible]
Clostridium sp.	[illegible]
Clostridium tetani	[illegible]
Actinomycetales	
Nocardia asteroides	[illegible]
Mycobacterium phlei	[illegible]

oder Indol abzubauen. Manche vermochten auch nicht die Aminosäuren L-Arginin, L-Lysin und D,L-Ornithin zu decarboxy= lieren oder Nitrat zu reduzieren.
Auffällig heben sich in den Tabellen 4a, b die Enterobacte= raceaen gegenüber den anderen Keimfamilien ab.

2. Einfluß der Inkubationsdauer auf das Reaktionsergebnis

Die maximale Versuchsdauer betrug 6 Stunden (24).
In jeder der untersuchten Stoffklassen fanden sich aber eini= ge Reaktionen, bei denen das positive Ergebnis an Farbände= rungen ohne nachträgliche Reagenzienzugabe ablesbar war, da Substrat und Indikator bereits im Ansatz vorhanden waren (Tabelle 2). Hieraus ist zu entnehmen, daß in solchem Fall die Reaktion weniger als 4 Stunden benötigt.
Weiteres Abwarten (wenn z.B. nach 4 Stunden bei der Ausfüh= rung der Kupplungsreaktionen der Reaktionsausfall negativ war) führt nach 6 Stunden weder zu einem positiven oder stärker positiven Ergebnis.
Zum Nachweis der Säurebildung aus Alkoholen und den Glycosi= den Aesculin, p-Arbutin und Salicin waren etwa 6 Stunden er= forderlich. Der Abbau von Kohlenhydraten unter Säurebildung war in vielen Fällen erst nach 4 Stunden am Umschlag des In= dikators Bromthymolblau von blau-grün über grün, hellgrün nach gelb zu beobachten.
In vielen Fällen wurden die Ansätze (Kohlenhydrate, Alkohol) bei fehlendem Indikatorumschlag bis zu 8 Stunden beobachtet, ohne daß das nach 4 Stunden festgestellte Ergebnis revidiert werden mußte. Eine Rückalkalisierung war also nicht zu be= obachten.

Tabelle 4a

Übereinstimmende Reaktionsergebnisse innerhalb der einzelnen Bakteriengruppen

Substrate	Pseudomonadales	Eubacteriales								Actinomycetales
		Achromobacteriaceae	Enterobacteriaceae	Brucellaceae	Micrococcaceae	Neisseriaceae	Lactobacillaceae	Corynebacteriaceae	Bacillaceae	
KNO_3 (Reduktion zu Nitrit)	o	-	+	o	o	o	-	o	o	+
D(-)Fructose (Säurebildung)	o	o	+	o	o	-	o	o	o	o
D-Glucose (Säurebildung)	o	o	+	o	o	o	+	o	o	-
Glycerin, Adonit, Dulcit, meso-Inosit, D(-)-Mannit, D(-)-Sorbit	o	-	o	o	-	-	-	-	-	-
Aesculin, p-Arbutin, D-Salicin, 6-Brom-2-naphthyl-ß-D-galactopyranosid, p-Nitrophenyl-ß-D-galactopyranosid, Phenolphthaleinglucuronid	o	-	o	o	o	-	o	o	o	o
Indoxyl-ß-D-glucosid	o	o	+	o	o	-	+	o	o	o
Natriumformiat (Alkalisierung)	o	o	+	o	o	-	-	-	o	o
Natriumcitat, Natriummalonat, Natriummucat, Natrium-d(-)-tartrat	o	o	o	o	-	-	-	-	-	o
L(+)-Cystein (H_2S-Bildung)	o	o	o	o	o	+	o	o	o	+
L-Phenylalanin (Phenylbrenztraubensäurebildung)	o	-	o	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 4b

Substrate	Pseudomonadales	Eubacteriales								Actinomycetales
		Achromobacteriaceae	Enterobacteriaceae	Brucellaceae	Micrococcaceae	Neisseriaceae	Lactobacillaceae	Corynebacteriaceae	Bacillaceae	
D,L.Tryptophan a) (Indolbrenztraubensäurebildung)	-	-	o	o	-	-	-	-	-	-
b) (Indolbildung)	o	-	o	o	-	-	-	-	-	-
L(+)-Arginin (Dihydrolysierung	o	o	o	-	o	-	-	o	o	o
L(+)-Lysin (Decarboxylierung)	o	-	o	o	-	-	-	-	-	o
L-Ornithin (Decarboxylierung)	-	-	o	o	-	-	-	-	-	o
p-Nitrophenyllaurat	+	+	o	o	+	+	+	+	+	+
p-Nitrophenylmyristat	o	o	o	o	o	o	o	o	o	+
a-Naphthylphosphat (pH 5,2 und pH 8,3)	o	o	+	o	o	o	o	o	+	o
Phenolphthaleindiphosphat (pH 5,4)	o	+	+	+	o	o	+	+	o	o
p-Nitrophenylphosphat (pH 1 0,5)	o	o	+	o	o	o	+	o	+	o

Zeichenerklärung:

+ = positiver Reaktionsausfall bei allen Keimen einer Bakteriengruppe

- = negativer Reaktionsausfall bei allen Keimen einer Bakteriengruppe

o = positive und negative Reaktionsergebnisse innerhalb der einzelnen Bakteriengruppen

Der Abbau der Aminosäuren L-Arginin, L-Lysin und D,L-Or= nithin erfolgte gewöhnlich in 2 - 3 Stunden.
Den größten Zeitbedarf benötigten die Ansätze, bei denen der Abbau der Carbonsäuren eine Alkalisierung bewirken soll= te. Nur Natriumformiat wird schneller abgebaut.
Aus den Ergebnissen ist zu folgern, daß eine Versuchsdauer von 4 Stunden in den meisten Fällen ausreicht.
In den nach 6 Stunden aus den Versuchsansätzen zur Rein= heitskontrolle entnommenen Proben (Ausstriche auf Blutagar und mikroskopische Untersuchung) ließen sich keine oder nur selten spärlich bakterielle Verunreinigungen nachweisen. In keinem Fall mußten Versuche wegen aerogener Kontaminationen durch Fremdkeime wiederholt werden.

3. Der Abbau der einzelnen Stoffklassen

a) Kohlenhydrate und Alkohole:

Bei dem Versuch, die Säurebildung aus Kohlenhydraten und Al= koholen zu beurteilen, traten vereinzelt Unsicherheiten da= durch auf, daß Bakterien den Indikatorfarbstoff reduzierten oder der Indikator lediglich bis zu hellgrün umschlug. Die erste Schwierigkeit ließ sich leicht durch Hinzutropfen von Indikatorlösung am Ende des Versuches beheben.
Lag eine helle Grünfärbung vor, so wurde auf die Färbung des Vergleichswertes mit n/100 NaOH zurücktitriert und da= nach entschieden, ob Säurebildung aus dem Substrat erfolgt war. Alle Substrate waren so eingestellt, daß höchstens 3 Tropfen n/100 HCl einen Farbumschlag von blau nach gelb be= wirken konnten. Die Säurebildung wurde angenommen, wenn mehr

als 5 Tropfen n/100 NaOH notwendig waren, um die Ausgangs=
färbung der Suspension wieder zu erreichen. Die Reaktion
wurde dann, gleichgültig, ob Säurebildung nachgewiesen wer=
den konnte oder nicht, als negativ oder unsicher beurteilt,
weil die Farbe des Indikators maßgebend für die Beurteilung
sein soll. Der Befund "hellgrün" - trotz gut nachweisbarer
Säurebildung - ist mit der Bildung von Puffern zu erklären.

Um Aufschluß über das unterschiedliche Verhalten beim Abbau
von Zuckern und Alkoholen zu bekommen, wurden auch positive
Ansätze grundsätzlich zurücktitriert. Es ließen sich stark
unterschiedliche Säuremengen (äquivalent 3-20 Tropfen n/100
NaOH) bei gleichen Zuckern nachweisen.
Die Befunde deuten darauf hin, daß der Nachweis der Säure=
bildung durch Indikatorumschlag ein mehrdeutiges Kriterium
für die Differenzierung ist. Weder können Stoffwechseltypen
unterschieden noch Säurebildungen stets mit Sicherheit er=
kannt werden.
Die mögliche Rückalkalisierung würde ebenfalls störend wir=
ken, da die Ansätze zur Vermeidung von Fehlurteilen minde=
stens jede Stunde kontrolliert werden müßten.

b) Carbonsäuren:

Natrium-mucat und Natrium-d(-)-tartrat wurden in keinem
Falle abgebaut. Der Abbau von Natrium-formiat erfolgte un=
gleich schneller als der von -citrat. Citratabbau unter Al=
kalisierung wurde in 10 Fällen, Abbau von Natriumformiat in
19 Fällen beobachtet.
Säurebildung aus Glucose und gleichzeitige Gasbildung aus

Natrium-formiat wurden bei Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Citrobacter freundii, Klebsiella pneumoniae und Proteus vulgaris, Gasbildung aus Glucose und aus Natrium-formiat wurden bei Escherichia coli, Citrobacter freundii, Klebsiella pneumoniae und Proteus vulgaris fest= gestellt, Gasbildung aus Glucose und Säurebildung aus Natrium-formiat kamen bei Escherichia coli, Citrobacter freundii, Klebsiella pneumoniae und Proteus vulgaris, Gas- und Säurebildung aus Glucose gleichzeitig bei Escherichia coli, Citrobacter freundii, Klebsiella pneumoniae und Pro= teus vulgaris zustande. Gasbildung aus Natrium-formiat ohne Säure- oder Gasbildung aus Glucose findet man bei Achromo= bacter haemolyticus (23-1).
Hieraus ist zu schließen, daß der Abbau von Glucose und Natrium-formiat nicht parallel gehen muß.

c) Glycoside

Der Abbau der Glycoside Aesculin, p-Arbutin und Salicin wurde in zweifacher Hinsicht kontrolliert, einerseits durch Beobachtung des Indikatorumschlages Bromthymolblau von blau nach gelb (Säuerung), anderseits durch direkten Nachweis der Spaltprodukte (6,7-Dihydroxycumarin, Hydrochinon, o-Hydroxybenzylalkohol). Spaltung und Säurebildung stimmten nicht immer überein, wie aus der Tabelle 5 zu ersehen ist. Die Differenzen könnten auf unterschiedlicher Empfindlich= keit des spezifischen Nachweises und der Indikatorreaktion, oder auch darauf beruhen, daß entweder nach der Spaltung keine Säurebildung erfolgt oder Säurebildung ohne Spaltung

Tabelle 5

	Aesculin	
	6,7-Dihydroxy-cumarin	Säurebildung
Pasteurella pseudo-tuberculosis	+	-
Aeromonas hydrophila	+	-
Serratia marcescens	+	-
Streptococcus faecalis	+	-
Nocardia asteroides	+	-
	p-Arbutin	
	Hydrochinon-Nachweis	Säurebildung
Salmonella typhi-murium	(+)	-
Klebsiella pneu-moniae	-	+
	D-Salicin	
	o-Hydroxyben-zylalkohol	Säurebildung
Salmonella typhi-murium	+	-
Citrobacter freun-dii	(+)	-
Serratia marcescens	+	-
Proteus vulgaris	+	-
Neisseria meningi-tidis	(+)	-
Diplococcus pneumo-niae	(+)	-
Streptococcus faecalis	(+)	-
Peptostreptococcus sp.	+	-
Clostridium tetani	+	-

eintritt. Eine Entscheidung hierüber setzt die Isolierung der Abbauprodukte voraus.

d) Aminosäuren:

Um die Spaltung der Aminosäuren L-Arginin, L-Lysin und L-Ornithin zu beobachten, wurde in den Ansätzen die Glucose fortgelassen. Damit war es möglich, eine Alkalisierung der Suspension auch dann zu erkennen, wenn Glucose nicht abgebaut wird. Beispiele hierfür sind die Dihydrolysierung von L-Arginin durch Arthrobacter pascens, Clostridium tetani und Nocardia asteroides, ferner die Decarboxylierung von L-Lysin durch Sarcina sp. und Nocardia asteroides.

e) Substrate der Esterasen und Lipasen:

Während a-Naphthylacetat von allen Bakterien gespalten worden ist, war kein Keim zur Spaltung von Naphthol-AS-acetat in der Lage. Hierfür können nicht nur Permeabilitätsdifferenzen verantwortlich sein, sondern vor allem auch spezifische, enzymatische Unterschiede (40). Durch Wiederholung der Versuche mit homogenisierten Keimen könnte entschieden werden, ob Permeabilitätsschranken oder spezifische Enzymeigenschaften den Abbau von Naphthol-AS-acetat bestimmen.

Aus Tabelle 3a, b ist ersichtlich, daß Naphthylester schlechter angegriffen werden als Phenylester. Bei Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae und Bordetella bronchiseptica wurde beobachtet, daß als einziges Esterase-Substrat Caprylsäure-ß-naphthylester abgebaut wird, nicht aber Indoxylacetat und Indoxylbutyrat. 12 Bakterienstämme spalten außer Carylsäure-

ß-napthylester nur noch die höheren Fettsäureester der Laurin- und Myristinsäure.
Diese Befunde deuten darauf hin, daß Enzymspezifitäten mit Hilfe unterschiedlicher Substrate nachweisbar sind.

f) Substrate der Phosphatasen:

Saure Phosphatasen sind häufiger nachzuweisen als alkali= sche Phosphatasen. Am regelmäßigsten wird a-Naphthylphosphat (pH 5,2) gespalten.
Die Ergebnisse mit Colaminphenolphthaleindiphosphat sind nicht mit in die Tabelle 3a, b aufgenommen worden, weil da gegenüber Phenolphthaleindiphosphat niemals qualitative, jedoch in einigen Fällen reproduzierbare quantitative Unter= schiede im Reaktionsausfall bestanden. So zeigten Aeromonas hydrophila und Listeria monocytogenes mit Colaminphenol= phthaleindiphosphat eine stärkere positive Reaktion als mit Phenolphthaleindiphosphat, während sich Serratia marcescens umgekehrt verhielt.

D. Besprechung

1. Problematik der Methode zur biochemischen Differenzierung von Bakterien

Die untersuchten Bakterienstämme (Tabelle 1) ließen sich durch ihre biochemischen Leistungen unterscheiden. Würde man die in Tabelle 3a, b angegebenen einzelnen Reaktionen unter der Voraussetzung, daß sie beliebige gleichwertige Stoffwechselleistungen charakterisieren, variieren, so hätte man 2^n Unterscheidungsmöglichkeiten, die allerdings durch gruppiertes Vorkommen der zu unterscheidenden Enzyme stark reduziert würden.

Wenn deren Existenz nur Voraussetzung wäre, daß ihre Kombination nicht letal wirkt, läge der Gedanke nahe, daß solche Gruppierungen sich im System der Bakterien wiederspiegeln müßten. Da Enzymmuster genetisch fixiert sind, ist das Vorkommen bakteriengruppenspezifischer Enzymkombinationen wahrscheinlich.

Sofern solche zur Charakterisierung einer ganzen Keimgruppe geeignete biochemische Leistungen im Rahmen dieser Arbeit überhaupt erfaßt wurden, müssen sie in der Tabelle 4a, b zu finden sein. Ob die dort zusammengestellten Unterschiede wirklich charakteristisch sind, kann erst nach Untersuchung einer großen Zahl von Stämmen jeder Keimgruppe entschieden werden. Setzt man voraus, daß die Unterschiede zwischen den Keimgruppen real sind, so ist ihnen bei der Differenzierung ein unterschiedliches Gewicht zuzuordnen. Gruppencharakteristische biochemische Kriterien zur Differenzierung wären somit höherwertig als solche, die zur Unterscheidung einzelner Stämme in der Gruppe dienen.

Über die Existenz gruppenspezifischer Enzymkombinationen findet man in der Literatur (z.B. 29 - 31) unterschiedliche Meinungen. Für die praktische Differenzierung ist man genötigt, höherwertige Kriterien anzunehmen, wie man es seit je tut, wenn man angibt, daß Bakterien z.B. kein Nitrat reduzieren, kein Gas aus Natriumformiat oder kein H_2S aus Cystein bilden. Umgekehrt findet man extrem häufige biochemische Leistungen, wie z.B. a-Naphthylacetat, das von allen hier untersuchten Keimen gespalten wurde. Dieses Verhalten könnte allerdings auch daran liegen, daß das Substrat extrem enzymunspezifisch ist. Hierfür spricht (32), daß einige Naphthylester sogar durch Albumin spaltbar sein sollen. Ähnliches gilt möglicherweise für p-Nitrophenylphosphat (33, 34). Es wurde 43 mal bei der Prüfung auf saure Phosphatasen (pH 4,8) und 34mal beim Nachweis alkalischer Phosphatasen (pH 10,5) gespalten.

2. Aussagekraft der einzelnen Testmöglichkeiten

Die hier angewandten Methoden zur Differenzierung von Bakterien lassen sich nur zum Teil mit anderen bisher gebräuchlichen Differenzierungsverfahren vergleichen, weil viele Reaktionen mit proliferierenden Bakterien nicht untersucht worden sind und zum Teil auch nicht untersucht werden können, weil entweder die Stabilität der Substrate für eine so lange Versuchsdauer nicht ausreicht oder Störungen bei den Nachweisreaktionen durch das komplexe Medium auftreten können.

Die mit nichtproliferierenden Bakteriensuspensionen ausgeführten Teste zeichnen sich gegenüber denen der "Bunten Reihe"

dadurch aus, daß ein positiver Reaktionsausfall mit Sicher= heit auf den Abbau eines bestimmten Substrates zurückzuführen ist, was in komplexen Medien nicht immer sicher beurteilt werden kann.

Ein weiterer Vorteil liegt darin, daß unsteril gearbeitet werden kann. Die Stoffwechselaktivität von das Medium zufäl= lig verunreinigenden aerogenen Fremdkeimen fällt gegenüber derjenigen einer Keimsuspension von durchschnittlich 6 mg/ml Trockensubstanz nicht ins Gewicht.

Stellt man die mit nichtproliferierenden Keimen nachgewiese= nen biochemischen Leistungen denen mit proliferierenden Kei= men gegenüber, so findet man, soweit es sich um den Abbau von Zuckern und Alkoholen handelt, bei den meisten Keimgrup= pen weitgehende Übereinstimmung (35 - 37).

Paralleluntersuchungen an proliferierenden und nichtprolife= rierenden Keimsuspensionen wurden an M. mallei ausgeführt (28) und ergaben Übereinstimmung beider Verfahren.

Unter der Voraussetzung gleicher Anzuchtbedingungen könnten im biochemischen Verhalten auftretende Unterschiede in engem Zusammenhang mit Wachstumsphasen (34, 38, 39), pH-, Redox= potential- und Permeabilitätsänderungen stehen.

Abweichungen, die einige Keime (Brucella suis, Actinobacil= lus lignieresii, Veillonella parvula, Neisseria meningitidis, Streptococcus faecalis und Erysipelothrix insidiosa) beim Ab= bau der Kohlenhydrate zeigten, mögen ihre Ursache darin haben, daß sie höhere Nährbodenansprüche haben, peroxydemp= findlich sind, nur in engem Temperaturbereich wachsen und eine geringe Tenazität besitzen.

Es muß aber auch daran gedacht werden, daß diese Keime im

Kochsalzmilieu sehr rasch desintegrieren und daß ein Teil der Fermente durch autolytische Vorgänge zerstört wird. Für diese Keime scheint das Verfahren nicht geeignet zu sein. Das könnte auch für diejenigen Reaktionen gelten, bei denen es keine Vergleichsmöglichkeiten mit gebräuchli= chen Testmethoden gibt.

E. Zusammenfassung

Das biochemische Verhalten nichtproliferierender Suspensio= nen von 47 verschiedenen Bakterienstämmen aus 12 Bakterien= gruppen wurde gegenüber 66 Substraten untersucht.
Die geprüften Keime gehörten hauptsächlich den Eubacteriales an: Rhizobiaceae, Achromobacteriaceae, Enterobacteriaceae, Brucellaceae, Bacteriodaceae, Micrococcaceae, Neisseriaceae, Lactobacillaceae, Corynebacteriaceae, Bacillaceae. Außerdem wurden noch 6 Stämme aus der Ordnung Pseudomonadales und 2 Stämme aus der Ordnung Actinomycetales untersucht. Die ver= wendeten Substrate stammten aus folgenden Stoffklassen: Kohlenhydrate, Alkohole, Glycoside, Carbonsäuren, Aminosäu= ren, Ester von Carbonsäuren und Phosphorsäuren.
Ein Teil der hier geprüften Substrate ist erstmalig zur Dif= ferenzierung von Bakterien angewendet worden.
Es konnte gezeigt werden, daß eine biochemische Unterschei= dung der Bakterien auch bei nichtproliferierenden Keimsuspen= sionen möglich ist. Die Befunde bei den Esterasen und Phos= phatasen deuten darauf hin, daß sich verschiedene Enzymspe= zifitäten mit Hilfe einer größeren Zahl von Substraten eben= so analysieren lassen wie z.B. mittels selektiver Ferment= hemmer.
Das Bürger'sche Kammersystem ermöglicht eine schnellere und umfassendere Keimanalyse als die bisherigen Verfahren, wobei eine Inkubationsdauer von 6 Stunden vollkommen ausreicht und geringfügige Kontaminationen nicht stören. Dadurch kann eine erregerspezifische Diagnose erleichtert und beschleunigt werden.

F. Literatur

1) KNOX, R.:
A screening plate for the rapid identification of faecal organisms.
J. Path. Bact. 61, 343-350 (1949)

2) SOTO, O.B.:
Fermentation reactions with dried paper discs containing carbohydrate and indicator.
Puerto Rico J. Publ. Health 25, 96-106 (1949)

3) HENRIKSEN, S.D.:
A comparison of the phenylpyruvic acid reaction and the urease test in the differentiation of proteus from other enteric organisms.
J. Bact. 60, 225-231 (1950)

4) HOYT, R.E.:
Tabletted substrates in the detection of indol and urease production by bacteria.
Amer. J. Clin. Path. 21, 892-893 (1941

5) COWAN, S.T.:
Fermentation: Biochemical micromethods for bacteriology.
J. Gen. Microbiol. 8, 391-396 (1953)

6) SNYDER, M.L.:
Paper discs containing enteric culture medicum for the differentiation of bacteria.
J. Path. Bact. 67, 217-226 (1954)

7) BOYD, W.L. and LICHSTEIN, H.C.:
The effect of carbohydrates on the tryptophanase activity of bacteria.
J. Bact. 69, 584-589 (1955)

8) SINGER, J. and VOLCANI, B.E.:
En improved ferric chloride test for differentiating proteus-providence group from other enterobacteriaceae.
J. Bact. 69, 303-306 (1955)

9) PICKETT, M.J., SCOTT, M.L. and HOYT, R.E.:
Tabletted medicum for biochemical tests in diagnostic bacteriology.
Amer. J. Med. Techn. 21, 170-174 (1955)

10) HOYT, R.E. and PICKETT, M.J.:
Use of "rapid substrate" tablets in the recognition of enteric bacteria.
Amer. J. Clin. Path. 27, 343-353 (1957)

11) SANDERS, A.C., FABER, J.E. jr. and COOK, T.M.:
A rapid method for the characterisation of enteric bacteria using paper discs.
Appl. Microbiol. 7, 36-40 (1957)

12) COOK, T.M. and PELCZAR, M.J. jr.:
Detection of hydrogen sulfide production by bacteria using paper discs methods.
Appl. Microbiol. 6, 193-197 (1958)

13) PETERSEN, K.F. und ABU-GHAZALEH, J.:
Schnellmethode zur routinemäßigen Prüfung der biochemi= schen Leistungen der Enterobacteriaceen.
Zbl. Hyg. (Orig.) 146, 510-521 (1960)

14) HUET, M.:
L'urease et la lysine décarboxylase de Haemophilus influenzae et des espèces apparentées.
Arch. Inst. Pasteur Tunis 36, 29-35 (1959)

15) LANYI, B. and ADAM, M.M.:
Agar diffusion test and micromethods for the rapid biochemical differentiation of enteric bacteria.
Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 7, 313-328 (1960)

16) ERLICH, H.:
A rapid semi-quantitative micro-spot plate technique for detecting small amounts of niacin in cultures of M. tuberculosis.
Amer. Rev. Resp. Dis. 86, 587-589 (1962)

17) KNOCHE, D.:
Über die Verwendung von substrat-indikatorhaltigen Fil= terpapierblättchen zur biochemischen Prüfung einiger Bakteriengruppen auf beliebigen festen Nährböden.
Inaugural Dissertation, Heidelberg, an der Med. Fak. der Ruprecht-Karl Univ. (1962)

18) HILL, G.A., FUNG, J. and MARCUS, S.:
A rapid test for proteus species.
J. Bact. 84, 191 (1962)

19) BERGQUIST, L.M. and SEARCY, R.L.:
A new micro fermentation technique for rapid detection of acid and gas.
Amer. J. Med. Techn. 28, 337-338 (1962)

20) EGLER, L. und TOTH, M.:
Biochemische Mikromethode zur Gruppenidentifizierung von Darmbatkerien.
Zbl. Bakt. (Orig.) 189, 294-297 (1963)

21) BÜLOW, W.:
The ONPG-test in diagnostic bacteriology. 2. Comparison of the ONPG-test and the conventional lactose-fermentation test.
Acta Path. Microbiol. Scand. 60, 387-402 (1964)

22) GANDELMAN, A.L. and MANN, P.H.:
An evaluation of reagent-impregnated paper strips for use in the process of identifying certain species of clinically important bacteria.
Curr. Ther. Res. 7, 130-138 (1965)

23) MANN, P.H. and GANDELMAN, A.L.:
An evaluation of reagent-impregnated paper strips for use in the process of identifying certain species of clinically important bacteria. II. Testing for the producing of indol.
Curr. Ther. Res. 7, 510-512 (1965)

24) BÜRGER, H.:
Ein Verfahren zur Prüfung zahlreicher biochemischer Leistungen nichtproliferierender Bakterien, dargestellt am Beispiel der Enterobacteriazeen.
Zbl. Bakt. (Orig.) 196, 469-476 (1965)

25) BÜRGER, H.:
Biochemische Leistungen nichtproliferierender Mikroorganismen. II. Nachweis von Glycosid-Hydrolasen, Phosphatasen, Esterasen und Lipasen.
Zbl. Bakt. (Orig.) 202, 97-109 (1967)

26) BÜRGER, H.:
Biochemische Leistungen nichtproliferierender Mikroorganismen. III. Nachweis von Arylsulfatasen und Peptidasen.
Zbl. Bakt. (Orig.) 202, 395-401 (1967)

27) TARSHIS, M.S.:
A rapid 24-hour micro-phenolphthalein sulfatase test for distinguishing M. avium from the unclassified Battey Bacilli.
Acta Tuberc. Scand. 45, 221-229 (1964)

28) MANNHEIM, W. und BÜRGER, H.:
Über physiologische Merkmale und die Frage der systema= tischen Stellung des Rotz-Erregers.
Z. med. Mikrobiol. u. Immunol. 152, 249-261 (1966)

29) SKINNER, C.E. and FLETCHER, D.W.:
A review of the genus candida.
Bact. Rev. 23, 397-419 (1960)

30) ROBERTS, C. and THORNE, R.S.W.:
Biochemical classification of yeasts.
Nature 188, 872-873 (1960)

31) BARNETT, J.A.:
Biochemical classification of yeasts.
Nature 189, 76 (1961)

32) TOVE, S.B.:
Esterolytic activity of serum albumin.
Biochim. Biophys. Acta 57, 230-235 (1962)

33) ALDRIGDE, W.N.:
Serum esterases, 2. An enzyme hydrolysing diethyl-p-nitrophenylphosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera.
Biochem. J. 53, 117-124 (1953)

34) ACKERMAN, G.A.:
Histochemical demonstration of aminopeptidase activity in the leucocytes of blood and bone marrow.
J. Histochem. Cytochem. 8, 386 (1960)

35) BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology
The Williams Wilkins Company, Baltimore (1957)

36) KAUFMANN, F.:
Enterobacteriaceae
Ejnar Munksgaard Published, Copenhagen (1954)

37) EDWARDS, P.R. and EWING, W.H.:
Identification of Enterobacteriaeceae
Burgess Publishing Company Minneapolis 15, Minnesota (1962)

38) COHEN, G.N. and MONOD, J.:
Bacterial permeases.
Bact. Rev. 21, 169-194 (1957)

39) YUE-LIANG PAN and BLUMENTHAL, H.J.:
Correlation between acid phosphatase and coagulase production or phage type of Staphylococcus aureus.
J. Bact. 82, 124-129 (1961)

40) UNDERHAY, E.E.:
The hydrolysis of indol esters by esterases of human blood.
Biochem. J. 66, 383-390 (1957)

Herrn Prof. Dr. med. R. SIEGERT, Direktor des Hygiene-Instituts der Universität Marburg/Lahn, danke ich für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes sowie für die uneingeschränkte Förderung meiner Arbeit.

Ferner bin ich Herrn Dipl.Chemiker Dr. med. H. BÜRGER für seine Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und Herrn Dr. med. W. MANNHEIM für die Überlassung der Bakterienstämme und freundliche Beratung zu herzlichem Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 2. November 1940 wurde ich, Klaus Royé, als Sohn des Apothekers Werner Royé und seiner Ehefrau Ingeborg, geb. Dallmeyer, in Osnabrück geboren. Die Reifeprüfung legte ich am 24. Februar 1961 in Cappel / Kreis Marburg ab. Im Sommersemester 1961 begann ich das Studium der Zahnmedi= zin an der Universität Hamburg. Am 9. März 1964 bestand ich an der Universität Marburg an der Lahn das Zahnärztliche Physikum. Die weiteren 5 klinischen Semester verbrachte ich an der Universität Hamburg, München und an der hiesigen Universität, wo ich am 2. Februar 1967 das Zahnärztliche Staatsexamen bestand. Seit Mai 1967 arbeite ich als Assistent in einer Zahnarztpraxis in Nieder-Ohmen/Oberhessen.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

in Marburg: Bücher, Gedigk, Hennis, Hering, Heuser, Hohorst, Janke, Klingenberg, Korb, Lang, Maurath, Niessing, Pantke, Petry, Rodeck, Rosemann, Schmid, Seidel, Siegert, Siess, Staib, Walcher

in Hamburg: Ahrens, Bautzmann, Fabian, Franke, Günther, Hausser, Heyns, Horstmann, Kirschner, Kosswig, Krauspe, Kühl, Kühnau, Menzel, Meyer, Müller, Nast, Neuert, Pfeiffer, Ritze, Schuchardt, Spiessl, Staubesand

in München: Ascher, Boette, Fruhmann, Heiss, Holle, Lang, Linzenmeyer, Nasemann, Schauer, Schwarz, van Thiel, von Werz.